

99

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :

2 825 627

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national :

01 07390

(51) Int Cl⁷ : A 61 K 7/48, A 61 K 35/78, A 61 P 17/00

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 06.06.01.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 13.12.02 Bulletin 02/50.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : GATTEFOSSE S.A. Société anonyme
— FR.

(72) Inventeur(s) : BURIGANA VERONIQUE ep. SIMARD
et CHARTON VIRGINIE.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET LAURENT ET CHARRAS.

(54) EXTRAIT DE BOUTONS FLORAUX DE CITRUS, UTILISATION ET COMPOSITION COMPRENANT LEDIT
EXTRAIT.

(57) Extrait de boutons floraux de citrus sous forme liquide
ou sèche, caractérisé en ce qu'il contient des citroflavonoï-
des dans une concentration comprise entre 0, 1 et 500 g/ kg
en poids d'extrait.

FR 2 825 627 - A1



**EXTRAIT DE BOUTONS FLORAUX DE CITRUS, UTILISATION ET
COMPOSITION COMPRENANT LEDIT EXTRAIT**

L'invention concerne un extrait de boutons floraux de citrus. Elle se rapporte
5 également aux différentes utilisations dudit extrait, de même qu'aux compositions
comprenant ledit extrait. Les citrus, appartenant à la famille des Rutaceae, sont des
arbres ou des arbustes persistants de petite taille, souvent à couronne dense. Les
fleurs des Citrus sont blanches et fortement parfumées. Les fruits sont des baies
très particulières, dont la peau se compose de deux couches (flavedo et albedo) et
10 dont la pulpe juteuse est divisée en segments. Les fruits des Citrus ou agrumes
font partie des espèces de fruits les plus anciennes. Ils étaient déjà cultivés en
Chine au 2^{ème} siècle avant J.C. Les espèces les plus importantes du genre Citrus
sont (sous-espèces et variétés associées) :

- Citrus sinensis (orange douce)
- 15 - Citrus aurantium (orange amère bigarade)
- Citrus aurantium ssp bergamia (bergamote)
- Citrus limon (citron)
- Citrus limetta (limette douce)
- Citrus aurantiifolia (limette acide)
- 20 - Citrus maxima (pamplemousse)
- Citrus reticulata (mandarine)

sans pour autant que cette liste soit limitative.

Dans la suite de la description et dans les revendications, par l'expression
25 "boutons floraux", on désigne les fleurs à l'état de bouton, c'est-à-dire non encore
épanouies.

On connaît plus particulièrement parmi les citrus, le bigaradier et l'oranger
doux. Le bigaradier, désigné également « oranger amer » est connu sous
30 différentes dénominations latines telles que Citrus Aurantium L. variété Amara,

Aurantium. Il est également connu sous le nom de Citrus amara ou Citrus bigaradia et Citrus vulgaris. Le bigaradier est à distinguer de l'oranger doux, connu sous la dénomination latine Citrus sinensis ou Citrus Aurantium L. variété Dulcis, dont les fruits, à la différence de ceux du Bigaradier, sont comestibles. Ces
5 deux arbres ont été largement étudiés et leurs fruits, feuilles et fleurs ont trouvé de nombreuses applications. Très utilisés pour leurs huiles essentielles, ils sont aussi source de pectine et flavonoïdes. Ainsi, par exemple, la pulpe des fruits de l'oranger doux contient un suc acidulé, riche en vitamine C et en vitamine P, qui est utilisé pour la fabrication de sirop rafraîchissant. Par expression (procédé
10 mécanique) de l'épicarpe frais de l'orange produite par l'oranger doux, on obtient l'huile essentielle d'orange douce, dénommée également "essence de Portugal", à distinguer de l'expression de l'épicarpe frais de l'orange produite par l'oranger amer, qui permet d'obtenir l'huile essentielle d'orange amer ou "essence de curaçao".

15

Par entraînement à la vapeur, les feuilles de l'oranger doux donnent "l'essence de Petitgrain du Portugal", tandis que celles de l'oranger amer donnent "l'essence de Petitgrain Bigarade". Par hydrodistillation, les fleurs fraîches d'Oranger doux donnent "l'essence de Néroli Portugal", tandis que celles de
20 l'oranger amer donnent "l'essence de Petitgrain Bigarade".

L'eau de fleur d'oranger est quant à elle obtenue par hydrodistillation des fleurs de bigaradier. Deux phases sont recueillies dans l'essencier, respectivement une phase supérieure constituée par l'essence de Néroli bigarade, et une phase
25 inférieure constituée par l'eau de fleur d'oranger contenant une petite part d'essence de Néroli Bigarade dissoute.

Les citroflavonoïdes, ou bioflavonoïdes, ou vitamine P, sont particulièrement abondants dans le péricarpe des fruits de citrus. La plupart de ces
30 citroflavonoides appartiennent au groupe des flavanones et se présentent, le plus

souvent, sous forme d'hétérosides, en particulier diholosides formés de rhamnose et de glucose, que l'on nomme rutinose et néohespéridose. Il s'agit des citroflavonoïdes majeurs qui sont à titre d'exemple la naringine, narirutine, néohespéridine, hespéridine, néoériocitrine, ériocitrine, néoponcitrine, poncitrine, ériodictine. Chaque espèce de citrus se caractérise par un groupe de flavanones définies. Ainsi, l'orange douce contient majoritairement de l'hespéridine et de la narirutine, de la néoériocitrine, de l'hespéridine, tandis que le citron contient de l'hespéridine et de l'ériocitrine, le pomelo de la naringine, la mandarine de la citronitrine et de l'hespéridine. Tous ces citroflavonoides présentent un certain nombre de propriétés telles que :

- anti-oxydant, piègeur de radicaux libres, anti-inflammatoire,
- action veinotonique (action vitaminique P, c'est-à-dire diminution de la perméabilité des capillaires et augmentation de leur résistance),
- action stimulante de la synthèse protéique ;
- effet inhibiteur d'enzymes tel que l'élastase...

Le Demandeur a constaté que de manière tout à fait surprenante, l'extraction solide/liquide à froid de boutons floraux de citrus suivie d'une étape de séparation solide/liquide, permettait d'obtenir un extrait riche en citroflavonoides. Il est de même tout à fait surprenant de constater que la teneur en citroflavonoïdes obtenue selon ce procédé est stable dans le temps, en faisant ainsi un extrait présentant des applications particulièrement intéressantes, notamment dans les domaines de la pharmacie et de la cosmétique.

L'invention concerne donc un extrait de boutons floraux de citrus, qui se caractérise en ce qu'il contient des citroflavonoides dans une concentration comprise entre 0,1 g/kg et 500 g/kg d'extrait.

Bien entendu, l'extrait de l'invention peut se présenter sous forme liquide ou solide.

- Lorsque l'extrait de boutons floraux se présente sous forme liquide, il présente une teneur en matière sèche totale comprise entre 5 et 100 g/kg, avantageusement comprise entre 10 et 30 g/kg, de préférence entre 11 et 13 g/kg.
- 5 Dans ce cas, la concentration en citroflavonoides dans ledit extrait est comprise entre 0,1 et 20 g/kg (en g de citroflavonoides par kg d'extrait liquide), de préférence entre 2,5 et 4 g/kg.

- Lorsque l'extrait de boutons floraux se présente sous forme sèche, il présente
- 10 alors une teneur en matière sèche issue des boutons floraux comprise entre 100 et 1 000 g/kg, avantageusement entre 300 et 600 g/kg. Dans ce cas, la concentration en citroflavonoides est comprise entre 5 et 500 g/kg, avantageusement entre 50 et 200 g/kg.

- 15 Pour disposer d'un extrait liquide stable dans le temps non seulement en terme de contamination bactérienne, mais également en termes de stabilités physique et de couleur, l'extrait de l'invention comprend en outre au moins un agent conservateur dans une concentration comprise entre 1 et 10 g/l, avantageusement comprise entre 5 et 7 g/l ainsi qu'éventuellement au moins un
- 20 agent anti-oxydant dans une concentration comprise entre 0,5 et 10 g/l, avantageusement comprise entre 1 et 2 g/l.

- En tant qu'agent conservateur microbiologique, on utilise de préférence un agent conservateur choisi dans le groupe des parabens (parahydroxybenzoate sous
- 25 forme de sels ou non). Par exemple, l'agent conservateur est un mélange de Phenonip® et de Nipastat® sodium.

- En tant qu'agent anti-oxydant, on utilise de préférence un anti-oxydant choisi dans le groupe des acides organiques (acide ascorbique, acide citrique,
- 30 acide gallique...).

Dans un mode de réalisation préféré, l'extrait est un extrait de boutons floraux de bigaradier.

5 L'invention concerne également le procédé de fabrication de l'extrait de boutons floraux de citrus précédemment décrit.

Ce procédé se caractérise en ce qu'il comprend une étape d'extraction solide/liquide desdits boutons floraux dans un solvant polaire.

10

L'étape d'extraction solide/liquide est choisie parmi les techniques de macération, digestion, percolation, extraction assistée par micro-ondes, par ultrasons par exemple.

15 Dans un mode de réalisation avantageux, l'étape d'extraction solide/liquide consiste en une macération à froid.

Selon une autre caractéristique du procédé, le ratio boutons floraux/solvant polaire est compris entre 1/99 et 20/80 (en poids).

20

En pratique, les boutons floraux de citrus se présentent sous forme de boutons floraux non éclos, ce qui signifie qu'ils sont cueillis avant épanouissement complet de la fleur. Les boutons mis en œuvre lors de l'étape d'extraction peuvent se présenter à l'état frais ou à l'état sec sous forme entière ou
25 broyée.

Pour éviter toute dégradation de substances actives hydrolysables, l'étape d'extraction est effectuée de préférence comme déjà dit à froid, avantageusement à une température comprise entre 3 et 10° C. La durée d'extraction dans ces
30 conditions est comprise entre 5 et 30 heures, et de préférence 20 heures.

Comme déjà dit, l'extraction est effectuée dans un solvant polaire utilisable dans une application cosmétique topique, donc en milieu aqueux ou alcoolique ou glycolique. En pratique, le solvant polaire est choisi dans le groupe comprenant
5 l'eau, l'éthanol, les glycols tels que propylène glycol, butylène glycol, seuls ou en mélange.

Selon une autre caractéristique du procédé, l'étape d'extraction est réalisée sous agitation et sous atmosphère d'azote, de manière à favoriser l'extraction des
10 composés actifs tout en protégeant lesdits composés de l'oxydation due à l'oxygène de l'air. L'étape d'extraction solide/liquide est ensuite avantageusement suivie d'une étape de séparation solide/liquide permettant d'éliminer les tourteaux. Cette étape peut être effectuée selon différentes méthodes, telles que par exemple égouttage, pressage, essorage, centrifugation ou filtration. Dans une forme de
15 réalisation avantageuse, l'extrait est ensuite soumis à au moins une étape de clarification, par exemple par filtration sur plaques, par filtration membranaire, filtration tangentielle, ou encore par centrifugation. L'extrait clarifié peut éventuellement être ensuite concentré, de manière à obtenir une forme liquide concentrée. L'étape de concentration peut être effectuée par exemple par
20 évaporation sous vide ou osmose inverse.

Dans une forme de réalisation avantageuse, les étapes de clarification ou de concentration sont suivies d'une étape de filtration stérilisante, avantageusement à 0,22 μm . L'extrait peut alors être conditionné en emballage stérile ou non. Dans le
25 cas d'un conditionnement non stérile et pour améliorer la stabilité de l'extrait, on peut incorporer dans l'extrait obtenu avant l'étape de filtration stérilisante au moins un agent conservateur microbiologique et éventuellement au moins un agent anti-oxydant dans une proportion de préférence comprise entre 1 et 20 g/l par rapport au volume total de l'extrait.

30

L'extrait peut être utilisé tel quel, c'est-à-dire sous forme liquide selon le procédé décrit ci-dessus. Lorsque l'on souhaite obtenir une forme sèche, l'extrait obtenu à l'issue de l'étape de séparation liquide/solide ou de clarification ou de concentration est ensuite séché. En pratique, l'extrait liquide, avec ou sans agent
5 de conservation et avec ou sans agent texturant tel que maltodexines, sirops de glucose..., est séché par lyophilisation, atomisation, ou évaporation sous vide.

Comme déjà dit, un tel procédé permet d'obtenir un extrait riche en citroflavonoides présentant des propriétés particulièrement intéressantes, de sorte
10 qu'il peut être utilisé notamment comme agent anti-radicalaire, anti-inflammatoire, veinotonique et veino-actif en diminuant la perméabilité des capillaires sanguins et en renforçant leur résistance, mais également comme stimulateur de la synthèse protéique et des éléments de la matrice extracellulaire. Parmi les citroflavonoides contenus dans l'extrait, on distingue en particulier la
15 néohespéridine, la naringine, l'hespéridine, l'ériocitrine et la narirutine.

Ainsi, par exemple, l'effet anti-radicalaire et anti-inflammatoire permettent d'envisager une utilisation comme protecteur vis-à-vis des stress environnementaux de la pollution et du vieillissement exogène, comme protecteur
20 des peaux sensibles, ou comme coactif dans les produits solaires. L'effet veinotonique permet d'envisager une utilisation comme anti-œdémateuse, par exemple pour le contour des yeux, comme décongestionnant, comme drainant par exemple dans les produits amincissants, mais également comme agent anti-couperose. Enfin, l'effet stimulateur de la synthèse protéique et des éléments de la
25 matrice extracellulaire, ainsi que l'effet inhibiteur d'enzymes permet d'envisager une utilisation comme anti-âge, anti-rides et tonifiant de l'élasticité cutanée.

Un tel extrait, sous forme liquide ou solide, peut être incorporé dans une composition cosmétique ou pharmaceutique.

L'invention concerne donc également une composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant l'extrait ci-avant décrit.

En pratique, la dite composition comprend une concentration en extrait sous
5 forme liquide comprise entre 0,5 et 20 %, avantageusement 5 à 10 % en poids.

Bien entendu, l'extrait pourra être incorporé dans la composition avec tout excipient usuel de formulation, en particulier avec tout véhicule pharmaceutique ou cosmétique acceptable. La composition sera généralement formulée pour être
10 appliquée sur la peau sous forme par exemple de lait, gel, crème, sérum, micro émulsions....

L'invention et les avantages qui en découlent ressortiront mieux des exemples de réalisation suivants à l'appui des figures annexées.

15

La figure 1 représente l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de l'invention sur une culture de keratinocytes par dosage de la libération de PGE_2 induit par un agent inflammatoire.

La figure 2 représente l'influence de l'extrait sur la production de MDA par
20 des cellules endothéliales soumis à une irradiation UVB.

La figure 3 représente l'activité stimulante de la synthèse protéique de l'extrait de l'invention sur des fibroblastes.

25 A/ Préparation de l'extrait de l'invention sous forme liquide

On effectue une macération à 4°C de 5 % de boutons floraux de bigaradier broyés dans 95 % d'eau adoucie sous agitation mécanique continue, et sous atmosphère d'azote pendant 20 heures.

30

Les résidus ou tourteaux d'extraction sont ensuite égouttés. L'extrait est alors filtré par plusieurs étapes successives de filtration sur plaques. On ajoute ensuite les conservateurs microbiologiques : PHENONIP® 0,4 % + Nipastat sodium 0,1 % sous agitation puis, acide citrique. L'extrait est enfin filtré sur membrane de 0,22 µm puis conditionné sous azote.

L'extrait obtenu présente un aspect limpide ambré à odeur caractéristique des boutons de fleurs de bigaradier. La teneur en matière sèche, hors agents de conservation, est de 10 à 17 g/l. La concentration en flavonoïdes totaux exprimée par rapport à la néohespéridine est égale à 3,2 g/l. La méthode de dosage des flavonoïdes est une méthode classique colorimétrique au chlorure d'aluminium et lecture de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible à la longueur d'onde de 386 nm.

Les citroflavonoïdes peuvent également être identifiés et quantifiés individuellement par HPLC. L'extrait obtenu contient les citroflavonoïdes suivants :

	Néohespéridine :	1,67 g/l
	Naringine :	1,09 g/l
20	Hespéridine :	0,21 g/l
	Néoériocitrine :	0,15 g/l
	Narirutine :	0,11 g/l

Cet extrait présente une excellente stabilité physico-chimique et micro biologique dans le temps.

B/ Propriétés de l'extrait

Tous les tests d'évaluation d'activité ont été réalisés sur la forme lyophilisée de l'extrait de l'invention.

a) Activité anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire de l'extrait de l'invention a été mis en évidence in vitro en milieu acellulaire, vis-à-vis de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle comparativement à deux témoins, respectivement la rutine et l'acide chlorogénique. L'activité anti-radical superoxyde de l'extrait est appréciée par la mesure du taux de réduction du NBT en absence et en présence du produit. Les vitesses de réduction du NBT par le radical superoxyde sont suivies à 556 nm en utilisant le système phenazine méthosulfate/NADH, comme source de radicaux superoxydes. L'activité anti-radical hydroxyle de l'extrait est appréciée par la mesure colorimétrique du taux de formaldéhyde formé par réaction du radical OH[·] sur le DMSO, en absence et en présence de produit. Le système PMS-NADH, en présence de traces de fer, est utilisé comme source de radicaux hydroxyles.

Les résultats figurent ci-après :

- activité anti-anion superoxyde

CE 50 = 65 µg par ml

CE 50 rutine = 50 µg par ml

(CE 50 = concentration efficace 50)

- activité anti-radical hydroxyle

CE 50 = 26 µg par ml

CE 50 acide chlorogénique = 18 µg par ml

Les résultats obtenus montrent que l'extrait de l'invention est capable d'inhiber de manière dépendante l'activité des radicaux superoxyde et hydroxyle.

Par ailleurs, les concentrations efficaces pour inhiber 50 % de l'activité de ces radicaux sont similaires à celles des inhibiteurs de référence choisis.

Comme déjà dit, cette propriété anti-radicalaire fait de l'extrait de l'invention un extrait utilisable comme protecteur des cellules cutanées vis-à-vis des stress environnementaux et notamment des UV, mais également vis-à-vis de la pollution, phénomènes stimulant la formation de radicaux libres.

Cet effet anti-radicalaire rend donc l'extrait de l'invention utilisable dans les produits protecteurs et de soins de jour, et les produits solaires.

b) Activité anti-inflammatoire

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de l'invention, on détermine les effets de cet extrait sur la libération de prostaglandine E_2 (PGE_2) par des kératinocytes humains en culture monocouche stimulés par l'agent anti-inflammatoire Phorbol Myristate Acetate.

On déclenche une réaction inflammatoire spécifique en activant les kératinocytes par du PMA (Phorbol Myristate Acétate) puis on mesure la production de PGE_2 par technique ELISA.

Les cellules ont été cultivées en présence du produit à l'essai pendant 24 h. Les milieux ont ensuite été renouvelés par des milieux frais contenant ou non le produit et en présence ou en l'absence de l'agent anti-inflammatoire phorbol 12-myristate 13-acétate (1 $\mu\text{g/ml}$ final ; PMA, Sigma P1585). Après 24 h de culture, les tapis cellulaires ont été observés et les milieux ont été récoltés et congelés. La viabilité cellulaire a été évaluée par quantification de l'activité métabolique des cellules (déshydrogénases mitochondriales) par mesure d'hydrolyse du MTT dans

chaque plaque. Après décongélation et centrifugation des milieux, les concentrations en PGE2 ont été mesurées à l'aide d'un kit ELISA (R & D Systems, ref DE0100), selon le protocole préconisé par le fournisseur.

5 Comme le montre le figure 1, le PMA a stimulé d'un facteur 16 la libération de PGE2. L'extrait de l'invention à 0,1 et 0,02 % permet de réduire de façon significative cette libération de PGE2 et ce, de manière dose dépendante (respectivement 30 % et 66 % du témoin).

10 Cette activité anti-inflammatoire peut être de même que précédemment utilisée pour lutter contre les stress environnementaux, dans la mesure où ces derniers favorisent l'expression de nombreux médiateurs épidermiques capables de conditionner le développement d'une inflammation, mais aussi pour lutter contre tout érythème chimique, actinique ou physique, ou pour le traitement des
15 peaux sensibles et hyper-réactives.

c) Activité veinoprotectrice

20 L'évaluation de l'effet de l'extrait de l'invention vis-à-vis de la protection de la paroi des capillaires a été réalisée in vitro sur des cellules endothéliales. Cet effet protecteur a été déterminé par la mesure de l'activité antiradicalaire de l'extrait par dosage du Malondialdéhyde (MDA) après irradiation UV. Le MDA est un des marqueurs essentiels de la cytotoxicité induite par les processus
25 oxydatifs de stress. Il provient de la réaction en chaîne déclenchée à l'intérieur des membranes cellulaires par les radicaux libres.

 L'essai a été réalisé sur des cellules endothéliales humaines cultivées en monocouche. La vitamine E (25 µM) a été prise comme référence positive.

30

Différents lots ont été constitués :

Lot 0	témoin négatif sans irradiation
Lot 1	témoin négatif avec irradiation
Lot 2	témoin positif Vitamine E sans irradiation
5 Lot 3	témoin positif Vitamine E avec irradiation
Lots 4 et 5	Lots traités avec l'extrait aux concentrations 1 et 10 $\mu\text{g/ml}$, sans irradiation
Lots 6 et 7	Lots traités avec l'extrait aux concentrations 1 et 10 $\mu\text{g/ml}$, avec irradiation

10

Les lots traités et irradiés ont été soumis immédiatement à une dose de rayons UVB de 100 mJ/cm^2 après traitement des cellules puis incubés 24 heures.

Le dosage du MDA après extraction se fait par mesure de la fluorescence
15 après séparation du complexe MDA-TBA par HPLC.

Les résultats obtenus révèlent qu'en absence d'UV, donc de stress oxydatif, l'extrait selon l'invention ne modifie pas le taux de MDA basal. En revanche, l'extrait présente un effet protecteur vis-à-vis des radicaux libres générés par les
20 UV puisque le taux de MDA libéré est significativement diminué par rapport au témoin irradié (20 et 26 % de protection respectivement aux concentrations de 10 $\mu\text{g/ml}$ et 1 $\mu\text{g/ml}$). Cet effet protecteur est au moins similaire à celui obtenu avec la Vitamine E.

25 L'extrait de l'invention, de par son effet veinotonique et veinoprotecteur, peut être utilisé comme déjà dit, pour protéger et renforcer le réseau capillaire cutané, notamment pour améliorer l'éclat du teint et l'état des peaux couperosées, mais également comme anti-œdémateux, décongestionnant, drainant, par exemple pour le contour des yeux ou dans les produits amincissants.

30

d/ Stimulation du métabolisme

L'activité stimulante du métabolisme a été évaluée sur des fibroblastes dermiques humains en culture monocouche. L'effet du produit sur la synthèse des protéines cellulaires et de la matrice extracellulaire a été mesuré. Cette synthèse a
5 été suivie en mesurant l'incorporation dans les protéines néosynthétisées, d'un acide animé précurseur radioactif, la leucine tritiée, en présence et en absence de l'extrait de l'invention, comparativement à un témoin de référence, l'EGF (Epidermal Growth Factor). Les fibroblastes cultivés en milieu SVF 10 % sont
10 incubés pendant 72 h avec différentes concentrations de l'extrait de l'invention (50, 150, 300, 450 µg/ml).

La leucine tritiée (^3H -Leucine) est ensuite ajoutée dans le milieu de culture. Après une période d'incubation de 24 heures, les protéines néosynthétisées sont
15 extraites par des techniques adaptées et l'incorporation du précurseur radioactif dans ces macromolécules est mesurée par scintillation liquide.

Les résultats (figure 3) montrent que l'extrait de l'invention stimule la synthèse protéique des fibroblastes. Cet effet est inversement proportionnel à la
20 gamme de concentrations testées et significatif pour des concentrations de 0,005 et 0,015 % (respectivement + 35 et + 25 % par rapport au témoin).

L'extrait de l'invention, de par son effet stimulant de la synthèse protéique, peut être utilisé comme déjà dit, comme actif anti-rides, anti-âge, pour lutter
25 contre le vieillissement cutané endogène, mais aussi comme tonifiant et stimulant de l'élasticité cutanée.

*C/ Compositions cosmétiques incorporant l'extrait de l'invention***1/ CREME PROTECTRICE JOUR**

	Désignation INCI	% p/p
TEFOSE ® 2561 (1)	PEG-6 stearate (et) ceteth-20 (et) glyceryl stearate (et) steareth-20	5,00
SOFCUTOL®B (1)	Ethoxydiglycol behenate	5,00
MOD (1)	octyldodecyl myristate	5,00
CEVENYL®(1)	Huile de graine de bourrache	2,00
CETYL ALCOHOL	Cetyl alcool	2,00
DOW CORNING 200 FLUID 350 CS	Dimethicone	5,00
FITODERM (3)	Squalane	3,00
PHENONIP (4)	Phenoxyethanol (et) methylparaben (et) butylparaben (et) ethylparaben (et) propylparaben	0,5
EAU DEMINERALISEE	Eau	62,30
GLYCERINE	Glycerine	4,30
CARBOPOL ULTREZ 10 (5)	Carbomer	0,15
RHODICARE D (6)	Gomme de Xanthane	0,25
SODIUM HYDROXIDE (10 % SOL)	Hydroxide de sodium	0,30
EXTRAIT DE L'INVENTION		5,00
PERFUME FLAIRITA N° 5 (7)		0,20

5 **Fabricants :** 1/ GATTEFOSSE SA 2/ DOW CORNING 3/HISPANO QUIMICA4/ NIPAS/ BF GOODRICH 6/ RHONE POULENC 7/ PAYAN ET BERTRAND

2/ LAIT PEAUX COUPEROSES

	Désignation	% p/p
PLUROL®STEARIQUE WL 1009 (1)	Polyglyceryl-6 Distearate	5,00
CETEARYL ALCOHOL	Cetearyl alcool	1,00
SHEA BUTTER	Shea Beurre	2,00
LABRAFAC®CC (1)	Caprylic/capric triglyceride	12,00
CEVENYL® (1)	Huile de graine de bourrache	2,00
PHENONIP (2)	Phenoxyethanol (et) methylparaben (et) butylparaben et) ethylparaben (et) propylparaben	0,60
EXTRAIT ORIGINE CITRON (1)	Citrus medica limonum (Lemon) Eau de fruit	71,10
SOLANACE STARCH (3)	Amidon de pomme de terre modifié	1,00
KELTROL T (4)	Gomme de xanthane	0,30
EXTRAIT DE L'INVENTION		5,00

10

Fabricants : 1/ GATTEFOSSE SA 2/ NIPA 3/ NATIONAL STARCH AND CHEMICAL LTD 4/ KELCO

3/ GEL CONTOUR DES YEUX

	Désignation	% p/p
EAU DEMINERALISEE	Eau	82,70
PHENONIP (2)	Phenoxyethanol (et) methylparaben (et) butylparaben (et) ethylparaben (et) propylparaben	0,50
GLYCERINE	Glycerine	10,00
CARBOPOL 940 (3)	Carbomer	0,60
SODIUM HYDROXIDE (10% SOL.)	Hydroxide de sodium	1,20
EXTRAIT DE L'INVENTION		5,00

Fabricants : 1/ GATTEFOSSE SA 2/ NIPA 3/ BF GOODRICH

REVENDICATIONS

1/ Extrait de boutons floraux de citrus, caractérisé en ce qu'il contient des
citroflavonoïdes dans une concentration comprise entre 0,1 et 500 g/kg en poids
5 d'extrait.

2/ Extrait selon la revendication 1, caractérisé en ce que lorsqu'il se présente
sous forme liquide, la concentration en citroflavonoïdes est comprise entre 0,1 et
20 g/kg.

3/ Extrait selon la revendication 1, caractérisé en ce que lorsqu'il se présente
sous forme sèche, la concentration en citroflavonoïdes est comprise entre 5 et 500
g/kg.

4/ Extrait selon la revendication 1, caractérisé en ce que lorsqu'il se présente
sous forme liquide, il contient en outre au moins un agent conservateur et au
moins un agent antioxydant.

5/ Extrait selon la revendication 1, caractérisé en ce que les boutons floraux
20 sont des boutons floraux de bigaradier.

6/ Procédé de fabrication d'un extrait de boutons floraux de citrus,
caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'extraction solide/liquide desdits
boutons floraux dans un solvant polaire.

7/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les boutons floraux
se présentent à l'état frais ou à l'état sec sous forme entière ou broyée.

8/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape d'extraction
30 solide/liquide consiste en une macération à froid.

9/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le solvant polaire est choisi dans le groupe comprenant l'eau, l'éthanol, le glycol, seul ou en mélange.

5

10/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape de séparation solide/liquide consiste en un égouttage, pressage, essorage, centrifugation ou filtration.

10

11/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape de séparation solide/liquide est suivie au moins d'une étape de clarification.

12/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'étape de clarification est suivie d'une étape de concentration.

15

13/ Procédé selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que les étapes de clarification ou de concentration sont suivies d'une étape de filtration stérilisante.

20

14/ Procédé selon l'une des revendications 6 ou 12, caractérisé en ce que l'extrait est ensuite séché par lyophilisation, atomisation, évaporation sous vide.

25

15/ Extrait selon la revendication 1, utilisé pour ses propriétés anti-radicalaire et anti-inflammatoire, comme protecteur vis-à-vis des stress environnementaux et du vieillissement exogène, comme protecteur des peaux sensibles ou comme coactif dans les produits solaires.

30

16/ Extrait selon la revendication 1, utilisé pour ses propriétés veinotoniques, et veinoprotectrices comme anti-oedémateux, décongestionnant, drainant et agent anti-couperose.

17/ Extrait selon la revendication 1, utilisé pour ses propriétés stimulatrices de la synthèse protéique et des éléments de la matrice extracellulaire comme agent anti-âge, anti-ride et tonifiant de l'élasticité cutanée.

5

18/ Composition cosmétique ou pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend l'extrait objet de la revendication 1.

19/ Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle
10 contient entre 0,5 et 20 % d'extrait sous forme liquide en poids.

DEPOSANT : **GATTEFOSSE S.A.**

MANDATAIRE : **Cabinet LAURENT et CHARRAS**

15

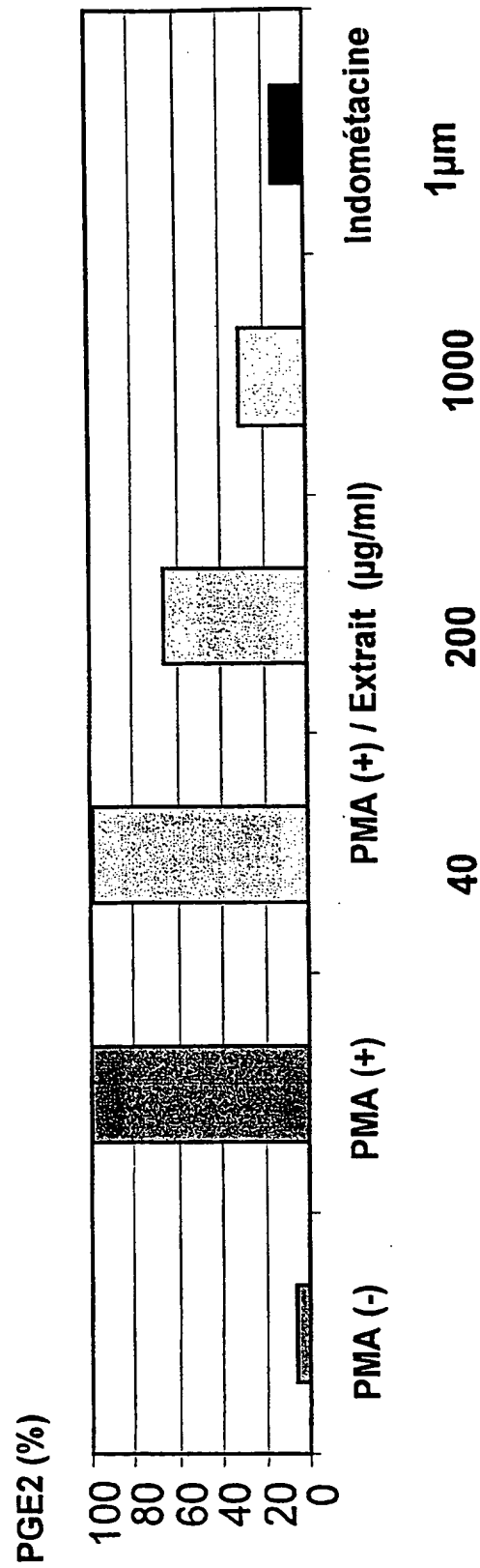


FIGURE 1

BEST AVAILABLE COPY

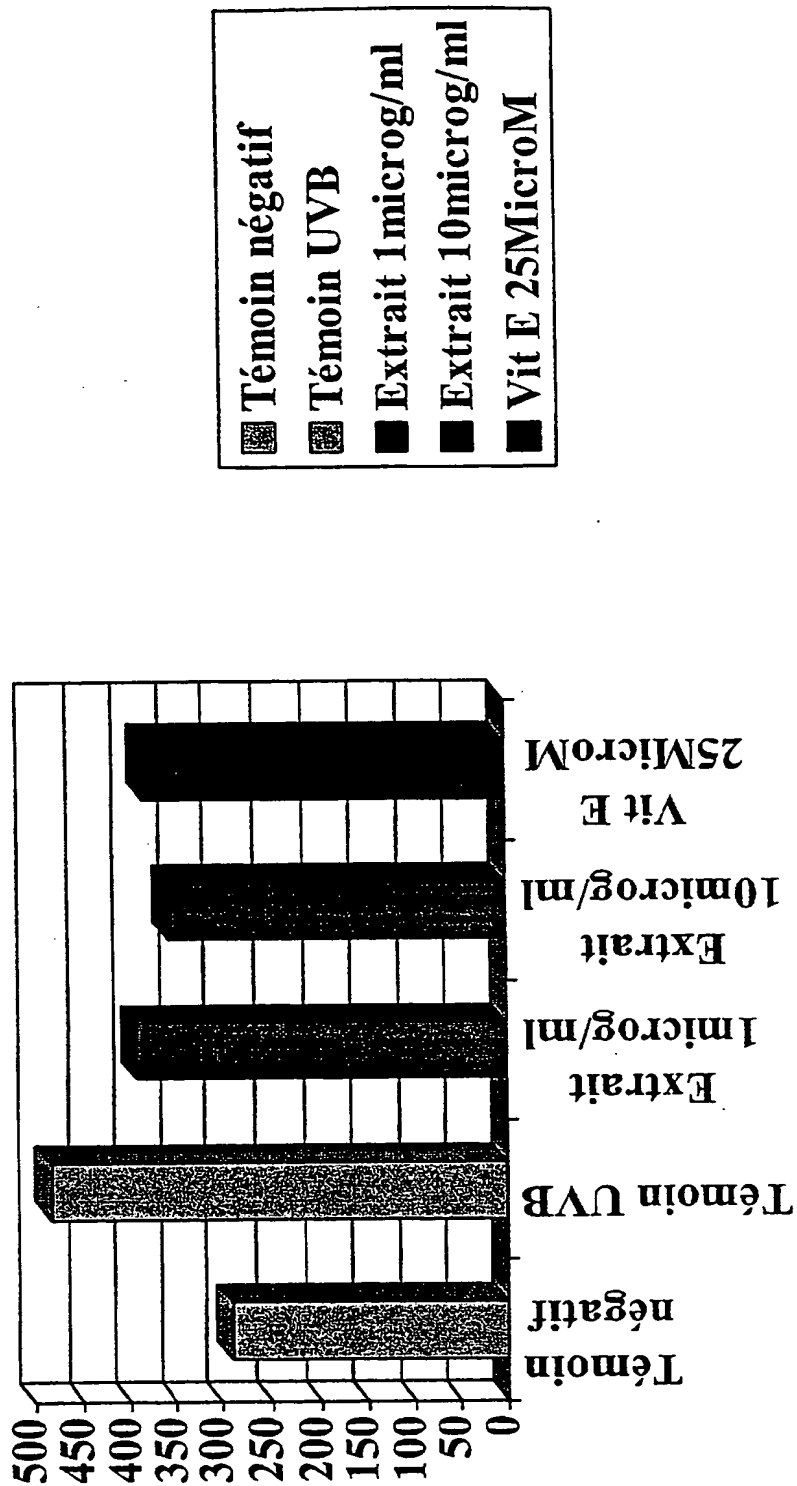


FIGURE 2

BEST AVAILABLE COPY

PLANCHE 3/3

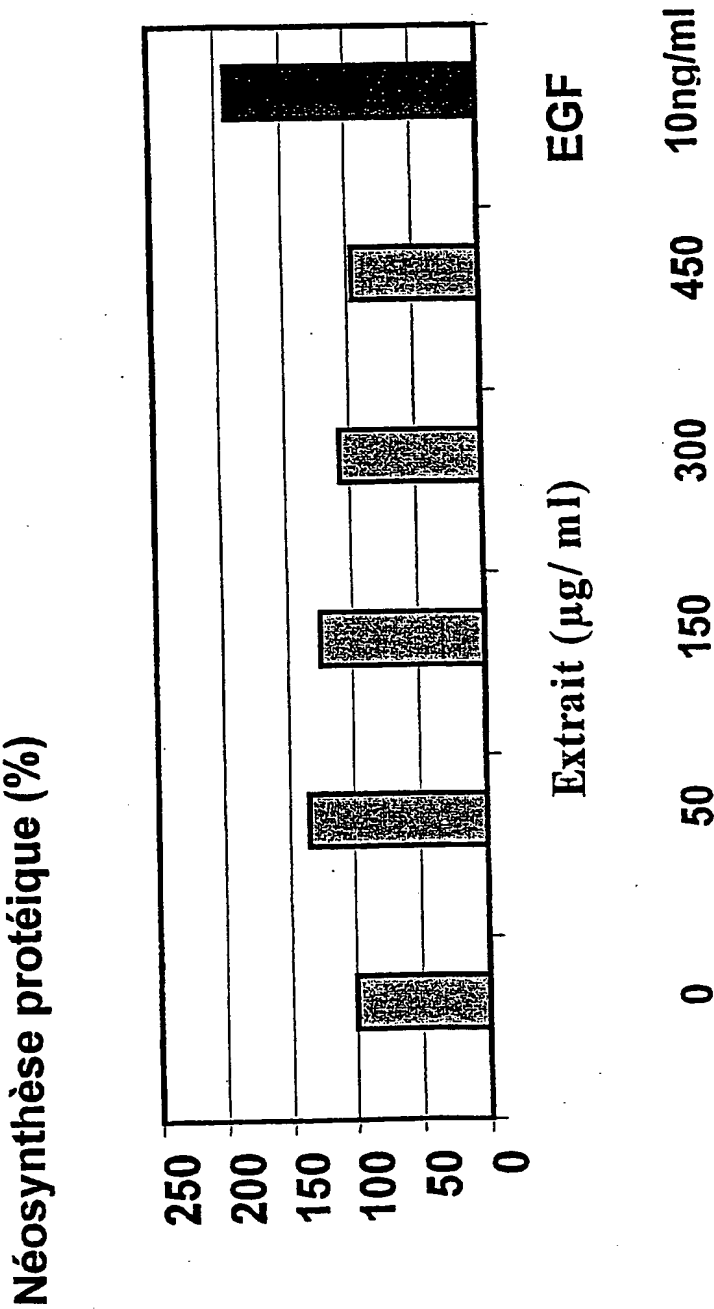


FIGURE 3

BEST AVAILABLE COPY



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 605265
FR 0107390

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	LEUNG, ALBERT Y. ET AL.: "Encyclopedia of common natural Ingredients used in food, drugs and cosmetics" 1996, JOHN WILEY & SONS, NEW YORK XP002192268 * page 393 - page 397 *	1,5,7, 15,18	A61K7/48 A61K35/78 A61P17/00
A	WO 98 50005 A (MEDLOGIC GLOBAL CORP) 12 novembre 1998 (1998-11-12) * page 60, ligne 47 - ligne 48; revendications 1,13 *	1,5,7, 15,18	
A	FR 2 578 165 A (CHICOURI MARCEL) 5 septembre 1986 (1986-09-05) * revendications 1-3 *	1,15,18	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
6 mars 2002		Angiolini, D	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1

EDP FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0107390 FA 605265**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 06-03-2002
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9850005 A	12-11-1998	AU 7472398 A EP 1011609 A1 WO 9850005 A1	27-11-1998 28-06-2000 12-11-1998
FR 2578165 A	05-09-1986	FR 2578165 A1	05-09-1986

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82